



(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
9 de Agosto de 2001 (09.08.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 01/57196 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C12N 9/16,  
15/55, 15/82, A01H 1/00, G01N 33/50

E-31006 Pamplona (ES). MUÑOZ PEREZ, Francisco,  
José [ES/ES]; Campus Arrosadía, Edificio El Sario,  
E-31006 Pamplona (ES).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES01/00021

(74) Mandatario: DE ELZABURU, Alberto; Miguel Angel,  
21, E-28010 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:  
1 de Febrero de 2001 (01.02.2001)

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Idioma de presentación: español  
(26) Idioma de publicación: español  
(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 2000000271 2 de Febrero de 2000 (02.02.2000) ES  
P 200001914 28 de Julio de 2000 (28.07.2000) ES

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente  
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*):  
UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA [ES/ES];  
Campus Arrosadía, Edificio El Sario, E-31006 Pamplona  
(ES). JCR PHARMACEUTICALS CO., LTD. [JP/JP];  
3-19 Kasuga-cho, Ashiya, 659-0021 (JP).

**Publicada:**  
— con informe de búsqueda internacional  
— antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES  
Dpto. SECRETARÍA GENERAL  
REFACCIONADA  
Pamplona, 1 - Madrid 28071

(54) Title: PLANT ADPGLUCOSE PYROPHOSPHATASE, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF, ITS USE IN THE PRODUCTION OF ASSAY DEVICES AND FOR OBTAINING TRANSGENIC PLANTS

**A1** (54) Título: ADPGLUCOSA PIROFOSFATASA VEGETAL, PROCEDIMIENTO DE OBTENCION, USO EN LA FABRICACION DE DISPOSITIVOS DE ENSAYO Y EN LA OBTENCION DE PLANTAS TRANSGENICAS

(57) Abstract: The invention describes plant AGPPase, ADPglucose pyrophosphatase/phosphodiesterase, a method for obtaining, purifying and characterizing said enzymes. The invention also describes the use of AGPPase in the production of assay devices for determining nucleoside-diphosphate sugar levels and in the obtention of transgenic plants having a reduced starch content and exhibiting high resistance to salinity.

(57) Resumen: La invención describe la enzima AGPPasa, ADPglucosa pirofosfatasa/fosfodiesterasa vegetal, su procedimiento de obtención, purificación y caracterización. Asimismo se describe el uso de la AGPPasa en la fabricación de dispositivos de ensayo para determinar niveles de azúcares-nucleosido-difosfato y en la obtención de plantas transgénicas con reducido contenido de almidón y resistencia a la salinidad.

WO 01/57196 A1

BEST AVAILABLE COPY

## TITULO DE LA INVENCION

ADPglucosa pirofosfatasa vegetal, procedimiento de obtención, uso en la fabricación de dispositivos de ensayo y en  
5 la obtención de plantas transgénicas.

## SECTOR DE LA TECNICA AL QUE SE REFIERE LA INVENCION

La invención se refiere al sector de la obtención, purificación y caracterización de isoformas del enzima ADPglucosa pirofosfatasa (AGPPasa), también llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, y a las aplicaciones de este enzima en la determinación de niveles de azúcares-nucleósidos, y de sulfonucleótidos y la obtención de plantas transgénicas en  
10 las que se sobreexpresa el gen de la AGPPasa dando lugar a plantas con reducido contenido en almidón y alta  
15 resistencia a salinidad.

## ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR

20 El almidón constituye la forma principal de almacenamiento de carbohidratos en los vegetales. Se acumula en grandes cantidades en órganos tales como semillas (trigo, cebada, maíz, guisante, etc.) y tubérculos (patata y batata entre  
25 otros), y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón es un polímero utilizado frecuentemente en las industrias papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, y también se utiliza como componente fundamental para la fabricación de plásticos  
30 biodegradables y pinturas de bajo impacto medioambiental. Otro polisacárido, la celulosa, es un componente fundamental de la pared celular de las plantas, la cual constituye la materia prima fundamental en procesos industriales

tan importantes como el de la producción de papel. Consecuentemente, el estudio de los procesos implicados en la síntesis de estos polímeros de glucosa constituye un tema prioritario en diversos ámbitos de la producción industrial.

El UDPglucosa (UDPG) es el precursor fundamental de la biosíntesis de la celulosa y de polisacáridos de pared celular. Por otro lado, el ADPglucosa (ADPG) es el precursor universal de la biosíntesis del almidón en tejidos de reserva de la planta. Su concentración en la célula resulta determinante para la cantidad y calidad del almidón producido por la planta. Las reflexiones acerca de los factores que gobiernan los niveles endógenos de ADPG en la célula vegetal han girado fundamentalmente en torno a sus enzimas sintetizadores, tales como la ADPG pirofosforilasa (AGPasa) y la Sacarosa sintasa (Preiss, (1988) "Biosynthesis of starch and its regulation". The Biochemistry of Plants. Vol. 14, Academic Press, New York, pp.182-249; Pozueta-Romero, J., Perata, P., Akazawa, T. (1999) "Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues". Crit. Rev. Plant. Sci. 18, 489-525). Sin embargo, poco se ha investigado en relación con la maquinaria responsable de la degradación de este azúcar-nucleótido (Feingold, D.S., Avigad, G. (1980) "Sugar transformation in plants". The Biochemistry of Plants. Vol. 3, Stumpf, P.K. and Conn, E.E. eds. Academic Press, New York, pp. 101-170). Existen indicios de que tanto bacterias como mamíferos disponen de una maquinaria enzimática capaz de hidrolizar azúcares-nucleótidos tales como el ADPG y el UDPG (Melo, A., Glaser, L. (1966) "Nucleotide diphosphate hexose pyrophosphatases". Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 524-531; Bessman, M.J., Frick, D.N., O'Handley, S.F. (1996) "The MutT proteins or Nudix hydrolases, a family of

versatile, widely distributed housecleaning enzymes". J. Biol. Chem. 271, 25059-25062; Rodríguez, P., Bass, S.T., Hansen, R.G. (1968) "A pyrophosphatase from mammalian tissues specific for derivates of ADP". Biochim. Biophys. Acta. 167, 199-201; Gasmí, L., Cartwright, J.L., McLennan, A.G. (1999) "Cloning, expression and characterization of YSA1H, a human adenosine 5'-diphosphosugar pyrophosphatase possessing a MutT motif". Biochem. J. 331-337). En plantas, tal tipo de actividad ha sido escasamente descrito en la literatura (Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zandueta-Criado, A., Pozueta-Romero, J. (2000) "Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis". Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 8705-8710; Baroja-Fernández, E., Zandueta-Criado, A., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2000) "Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphatase and ADPglucose pyrophosphorylase occur in the suspension-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.)". FEBS Lett. 480, 277-282; Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zandueta-Criado, A., Moreno-Bruna, B., Muñoz, F.J., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2001) "Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein". FEBS Lett. (en prensa).  
En diversas industrias, el almidón constituye un agente viscosizante y gelificante de primera necesidad. La biosíntesis del almidón en la célula vegetal a partir del ADPG tiene lugar en el compartimento subcelular denominado plástido. Tanto la síntesis como la degradación del ADPG se producen en este compartimento y por tanto el control de los niveles de almidón puede tener lugar mediante el control de los procesos reguladores de los niveles de ADPG.

WO 01/57196

4  
Las diferentes aplicaciones del almidón producido en una planta están basadas en el balance de amilosa y amilopectina, el cual determina la estructura del gránulo de almidón, así como su viscosidad en suspensiones acuosas.  
5 Tal proporción de amilosa y amilopectina depende de la concentración de ADPG en la célula vegetal. No se conoce hasta el momento ningún procedimiento para regular las características del almidón producido en una planta mediante el control de la degradación de ADPG, que el enzima descrito en la presente invención, puede propor-  
10 cionar.

Además de actuar como sustancia de reserva para la planta, el almidón se acumula en la célula vegetal en circunstancias en las que la planta no está sometida a condiciones de stress hídrico. En condiciones en las que la planta se ve sometida a altas temperaturas o altas concentraciones de sales en el medio, la planta deja de acumular almidón, produciendo grandes cantidades de azúcares solubles que se acumulan en la vacuola (Keeling, P.L., Bacon, P.J., Holt, D.C (1993) "Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase" Planta 191, 342-348; Geigenberger, P., Geiger, M., Stitt, M. (1998) "High-temperature perturbation of starch synthesis is attributable to inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase by decreased levels of glycerate-2-phosphate in growing potato tubers" Plant Physiol. 117, 1307-1316). Además de estas alteraciones adaptativas del metabolismo de carbohidratos al stress hídrico, la planta experimenta alteraciones de su metabolismo del azufre, evitando la acumulación del adenosine-5'-phosphate (PAP) procedente de la transformación de adenosina 5'-phosphosulfate (APS) y 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) (Gil-Mascarell, R., López-Coronado,

J.M., Bellés, J.M., Serrano, R., Rodríguez, P.L. (1999) "The Arabidopsis HAL2-like gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase" Plant J. 17, 373-383). A partir de estas observaciones, es posible que reacciones enzimáticas responsables de la hidrólisis del ADPG, APS y PAPS sean responsables de procesos adaptativos de la planta a las condiciones de stress hídrico.

Las técnicas cromatográficas y radiológicas constituyen una poderosa herramienta de determinación de niveles de nucleótidos tales como sulfonucleótidos (APS y PAPS entre otros; Yoshida, H., Fukui, S., Yamashina, I., Tanaka, T., Sakano, T., Usui, T., Shimotsuji, T., Yabuuchi, H., Owada, M., Kitagawa, T. (1982) "Elevation of nucleotide pyrophosphatase activity in skin fibroblasts from patients with Lowe's syndrome". Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1144-1150) y azúcares-nucleósido difosfato (tales como los derivados de glucosa, ribosa, manosa, galactosa, ácido glucurónico, fructosa y ácido galacturónico) en extractos crudos de origen animal, vegetal o microbiano. Aunque de uso muy generalizado, requieren una inversión importante en equipamientos y en la preparación de las muestras problema. Lamentablemente, se hace escaso uso de posibles métodos alternativos que permitan la detección y cuantificación de azúcares-nucleótidos y sulfonucleótidos de una manera simple y eficaz. El análisis de los niveles en sangre, músculo, riñón o hígado de algunos de los azúcares-nucleótidos mencionados son importantes en clínica (Cortes, P., Dumler, F., Sastry, K.S., Verghese, C.P., Levin, N.W. (1982) "Effects of early diabetes on uridine diphosphosugar synthesis in the rat renal cortex". Kidney Int. 21, 676-682; Spiro, M.J. (1984) "Effect of diabetes on the sugar nucleotides in several tissues of the rat" Diabetologia 26, 70-75; Sochor, M., Kunjara, S., Baquer, N.Z., McLean, P.

(1991) "Regulation of glucose metabolism in livers and kidneys of NOD mice". Diabetes 40, 1467-1471). Así por ejemplo, dado que el UDPglucosa es el precursor del glucógeno en animales, el análisis de los niveles de esta molécula puede ser importante en el estudio y el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos como por ejemplo distintos tipos de diabetes. Por otro lado, la determinación de los niveles de PAPS en orina es fundamental para el diagnóstico de enfermedades graves tales como el síndrome de Lowe o el síndrome antifolípido (Yoshida, H., Fukui, S., Yamashina, I., Tanaka, T., Sakano, T., Usui, T., Shimotsuji, T., Yabuuchi, H., Owada, M., Kitagawa, T. (1982) "Elevation of nucleotide pyrophosphatase activity in skin fibroblasts from patients with Lowe's syndrome". Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1144-1150; Amigo, M.C., García-Torres, T. (2000) "Morphology of vascular, renal, and heart lesions in the antiphospholipid syndrome: relationship to pathogenesis" Curr. Rheumatol. Rep. 2000, 2, 262-270). Evidentemente, la posibilidad de analizar de manera simple y poco costosa los niveles de estas sustancias en una muestra constituye una alternativa ventajosa respecto a las técnicas cromatográficas.

La invención describe la purificación y aplicaciones de un producto enzimático de origen vegetal que denominamos AGPPasa que cataliza la hidrólisis de pequeñas moléculas con enlaces fosfodiéster o fosfosulfato entre las que destacan el ADPG, el APS, y el UDPG por ser los substratos preferentes.

El enzima vegetal objeto de la invención presenta diversas isoformas en los tejidos vegetales de los que puede obtenerse (Baroja-Fernández, E., Zandueta-Criado, A., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2000)

"Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphatase and ADPglucose pyrophosphorylase occur in the suspension-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). FEBS Lett. 480, 277-282). La isoforma de extracción más sencilla 5 es la que denominados soluble, mientras que otras isoformas, que podemos denominar particuladas, se encuentran íntimamente adheridas a los gránulos de almidón, de tal modo que para obtenerlas es preciso destruir el gránulo hidrolizando el almidón.

10 En la presente invención se consiguió secuenciar parcialmente dos isoformas de AGPPasa; una soluble y otra asociada al gránulo de almidón de las plantas. Tras comparar los fragmentos secuenciados de la isoforma soluble con las secuencias disponibles en los bancos de datos, se concluye 15 que es una proteína perteneciente al grupo de las germin-like cuya función se desconocía hasta el momento (Vallelian-Bindschedler, L., Mössinger, E., Métraux, J-P., Schweizer, P. (1998) "Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley that is 20 insolubilized in stressed leaves". Plant Mol. Biol. 37, 297-308; Hurkman, W.J., Tao H.P., Tanaka, C.K. (1991) "Germin-like polypeptides increase in barley roots during salt stress". Plant Physiol. 97, 366-37; Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zandueta-Criado, A., Moreno- 25 Bruna, B., Muñoz, F.J., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2001) "Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein". FEBS Lett. (en prensa). El número de 30 acceso de la proteína germin-like de cebada disponible en el banco de dato de la EMBL es: Y15962. La amplia distribución de la AGPPasa en el reino vegetal queda demostrada tras la constatación de la existencia de

secuencias nucleotídicas similares a las del gen de la AGPPasa de cebada en especies tales como arroz (número de accesión AB010876) y *Arabidopsis thaliana* (número de acceso U95034) (Carter, C., Graham, R.A., Thornburg, R.W. (1998)

5 "Arabidopsis thaliana contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members" Plant Mol. Biol. 38, 929-943).

Un objeto de la invención es, en primer lugar, la obtención  
10 de una isoforma soluble de AGPPasa en forma sustancialmente pura, a partir de tejidos vegetales, y su caracterización. Otro objeto es la obtención de la secuencia aminoacídica de la AGPPasa soluble de cebada (*Hordeum vulgare*, cv. Scarlett) y su contraste con las secuencias disponibles en bases de datos, identificándose el gen que la codifica y sintetizándose un cDNA completo que codifica para la misma. Identificado el gen, se detalla el diseño de construcciones derivadas del mismo destinadas a la obtención de plantas transgénicas con alta actividad AGPPasa  
20 cuyo contenido y calidad del almidón, así como el de polisacáridos de pared celular, estén modificados respecto a las plantas control. Tales plantas no acumulan el marcador de toxicidad osmótica PAP, de modo que son más resistentes a altas concentraciones de sales que las  
25 plantas control. Otro objeto de la invención es la purificación y caracterización de una isoforma de AGPPasa asociada al gránulo de almidón de tomate (*Lycopersicon esculentum*), que también se denomina AGPPasa particulada.

Otro objeto de la invención es el procedimiento seguido  
30 para la elaboración de dispositivos o kits de determinación de azúcares-nucleósido difosfatos y sulfonucleótidos basados en el empleo del producto enzimático con actividad AGPPasa. Tal y como se ha explicado en el Estado de la

Técnica Anterior, el UDPglucosa es el precursor del glucógeno en animales, de modo que sus niveles en diversos tejidos y órganos (sangre, músculo, hígado) están relacionados con las diversas situaciones, patológicas o no, del metabolismo glucídico. Por este motivo, el disponer de kits para la determinación sencilla, rápida y económica de azúcares nucléosidos presenta un notable interés para la industria de productos biomédicos, tanto de diagnóstico como de investigación en fisiología.

10

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La obtención y purificación del producto vegetal con actividad enzimática AGPPasa objeto de la invención puede hacerse a partir de cualquier tejido vegetal de cualquier especie, como puede ser cualquier Monocotiledónea o Dicotiledónea, como por ejemplo, cebada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), pimiento (*Capsicum annuum*), tomate (*Lycopersicon sculentum*), patata (*Solanum tuberosum*), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), o arce (*Acer pseudoplatanus L.*), por citar sólo algunos de los innumerables ejemplos representativos de diferentes familias y géneros.

25 **Obtención y purificación de una isoforma soluble de AGPPasa:**

El método general de obtención y purificación de la AGPPasa soluble vegetal descrito en la invención incluye los siguientes pasos, en los que pueden admitirse pequeñas variaciones que no modifiquen sustancialmente el esquema general del procedimiento de extracción y purificación, a partir de cualquier tejido vegetal:

1. Homogeneización del tejido vegetal con un tampón de extracción.
2. Filtración a través de cuatro capas de Miracloth® (tela filtrante para suero lácteo empleada en industrias queseras).
3. Ultracentrifugación del homogeneizado filtrado.
4. Precipitación en sulfato amónico de las proteínas del sobrenadante.
- 10 5. Resuspensión del precipitado en tampón de pH 4,2.
6. Calentamiento durante al menos 15 minutos a una temperatura entre 60 y 65°C.
7. Centrifugación.
8. Concentración del sobrenadante y purificación de la proteína por cromatografía de filtración en gel. La actividad enzimática de la AGPPasa se detecta mediante la detección de la producción de G1P y AMP en muestras incubadas con ADPG. Opcionalmente, una de las mejoras introducidas en el método descrito anteriormente en la invención consiste en 20 la utilización adicional, en la etapa de purificación de la enzima, de una cromatografía de intercambio catiónico. Asimismo otra de las mejoras opcionales consiste en la introducción de una nueva etapa de cromatografía en columnas de afinidad del tipo Concanavalina A.
- 25 9. Isoelectroenfoque. La posición de la AGPPasa puede determinarse fácilmente de alguna de las siguientes maneras:
  - a) Elución de la proteína y posterior detección de la producción de G1P en presencia de ADPG.
  - b) Incubación del gel en una solución con bis-paranitrofenilfosfato (bis-PNPP) y revelado en una solución básica según se describió por Nishimura y Beevers (Nishimura, M., Beevers, H (1978) Plant Physiol. 62, 44-48).

11

10. Separación por electroforesis de la proteína en gel desnaturalizante en un sistema de tampones neutros o ligeramente ácidos tales como el NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Novex, San Diego, California). La posición de la AGPPasa 5 puede determinarse fácilmente de alguna de las siguientes maneras:

- a) Elución de la proteína y posterior detección de la producción de G1P en presencia de ADPG.
- b) Incubación del gel en una solución con bis-PNPP y 10 revelado en una solución básica.

**Obtención y purificación de una isoforma de AGPPasa adherida al gránulo de almidón (isoforma particulada).**

15 El método general de obtención y purificación de la AGPPasa particulada vegetal incluye los siguientes pasos, en los que pueden admitirse pequeñas variaciones que no modifiquen sustancialmente el esquema general del procedimiento de extracción y purificación, a partir de cualquier tejido 20 vegetal:

- 1: Homogeneización del tejido vegetal con un tampón de extracción.
- 2: Filtración a través de cuatro capas de Miracloth®.
- 25 3: Centrifugación del homogeneizado filtrado a 20000 g.
- 4: Resuspensión del precipitado en un tampón con 3% Triton X-100.
- 5: Centrifugación a 20.000 g.
- 6: Resuspensión del precipitado en un tampón con MgCl<sub>2</sub> 200 30 mM o bien con enzimas hidrolíticos del almidón tales como la α-amilasa, β-amilasa y amiloglucosidasa.
- 7: Concentración del sobrenadante obtenido tras centrifugación a 20000 g y purificación de la proteína por

14

distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein".  
FEBS Lett. (en prensa)).

- Es resistente a la acción de una amplia gama de proteasas, como Proteinasa K y Pronasa (Boehringer).
- 5 ■ Su actividad no se ve afectada por la acción de inhibidores típicos de fosfodiesteras tales como el  $\beta$ -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida, ascorbato, y otros agentes reductores y quelantes.
- Es sensible a pH ligeramente básico y es muy estable a pH 10 entre 4 y 7,5.

**Obtención de un cDNA completo que codifica para la AGPPasa soluble.**

15 Conocida la secuencia aminoacídica de la AGPPasa se contrastó con otras existentes en los bancos de datos. Ello permitió identificar el gen que codifica para la AGPPasa. El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la AGPPasa permitió la creación de dos 20 cebadores específicos del gen de la AGPPasa. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de RT-PCR un cDNA completo que se introdujo en el sitio de restricción EcoRV del plásmido pSK Bluescript (Stratagene) dando lugar a la construcción AGPPase-cDNAsK<sup>-</sup> la cual fue 25 amplificada en la bacteria hospedadora E. Coli XL1 Blue. Cepas de dicha bacteria transformada fueron depositadas el 23.06.00 en la Colección Española de Cultivos Tipo, sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, Burjasot 46100 (Valencia, España) con 30 el número de depósito CECT 5338.

**Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan el cDNA de la AGPPasa soluble**

AGPPase-cDNAsK<sup>-</sup> fue digerido secuencialmente con los enzimas HindIII, T4 DNA polimerasa y XbaI. El fragmento liberado (que contiene el cDNA de AGPPsa) fue clonado en el 5 plásmido pVT<sup>-</sup>BSP tras haber sido digerido secuencialmente por los enzimas NcoI, T4 DNA polimerasa y XbaI. De este modo se obtiene un plásmido denominado pVT<sup>-</sup>BSP-GL el cual posee el promotor constitutivo 35S, el cDNA de la AGPPasa y el terminador Nos.

10 Para poder transferir esta construcción al genoma de las plantas via *Agrobacterium tumefaciens*, es preciso que previamente sea clonada en un plásmido binario. Para ello, pVT<sup>-</sup>BSP-GL fue digerido secuencialmente con los enzimas HindIII, T4 DNA polimerasa y XbaI y se clonó dentro del 15 plásmido binario pCGN1548 (McBride, K.E., Summerfelt, K.R. (1990) "Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation". Plant Mol. Biol. 14, 269-276) que previamente había sido digerido secuencialmente con los enzimas HindIII, T4 DNA polimerasa y XbaI. El plásmido así 20 obtenido se designó con el nombre de pCGN154835SGL. Tras amplificarse en *E. coli* (XLI Blue), pCGN154835SGL se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* (CECT 5387) el cual fue utilizado para transformar especies tales como tomate, tabaco, patata, etc. (Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, 25 N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985) "A simple and general method for transferring genes into plants" Science 277, 1229-1231. Cepas de *Agrobacterium tumefaciens* fueron depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo, sita en el Edificio de Investigación de la 30 Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, Burjasot 46100 (Valencia, España), con el nº de depósito CECT5387, el 10.01.01.

16

Elaboración de dispositivos (kits) de ensayo para determinación de azúcares-nucleósido difosfatos y sulfonucleótidos.

5 Los kits diseñados para la determinación de nucleótidos tales como azúcares-nucleósido difosfatos y sulfonucleótidos están basados en la acción del producto con actividad AGPPasa sobre enlaces fosfodiéster y fosfosulfato de pequeñas moléculas que, tras ser hidrolizadas, dan lugar a  
10 otras moléculas de fácil detección y cuantificación.

Las dos estrategias más convenientes para la elaboración de estos kits parten de la hidrólisis del azúcar-nucleósido difosfato mediante el enzima objeto de la presente invención, esto es, AGPPasa, produciendo cantidades equimolares de azúcar-1-fosfato y del correspondiente nucleósido mono-fosfato. A partir de aquí puede plantearse la determinación de la cantidad de nucleótido inicialmente existente en la muestra a partir de la determinación de la cantidad de azúcar-1-fosfato y nucleósido monofosfato producidos, según se especifica a continuación:

- En el caso de que el azúcar-1-fosfato sea glucosa-1-P (G1P), se somete dicho compuesto a la acción del enzima fosfoglucomutasa rindiendo glucosa-6-fosfato, que a su vez puede hacerse reaccionar acopladamente con NAD<sup>+</sup> por acción del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, obteniéndose 6-fosfogluconato y NADH, fácilmente determinable.
- En el caso de que el azúcar-1-fosfato no sea G1P, la determinación del azúcar-1-fosfato y del nucleósido mono-fosfato tiene lugar mediante determinación colorimétrica del ortofosfato (Pi) producido tras la hidrólisis de estos compuestos con fosfatasa alcalina. Alternativamente, se puede utilizar como enzima acoplador la 5'-nucleo-

17

tidasa la cual hidrolizará el nucleósido mono-fosfato en cantidades equimolares del nucleósido correspondiente y Pi. El Pi liberado en cualquiera de los dos casos resulta fácilmente cuantificable por métodos colorimétricos 5 conocidos.

La estrategia de determinación de niveles de sulfo-nucleótidos tales como el APS, se basa en la hidrólisis de estos nucleótidos y consiguiente producción de cantidades equimolares de sulfato, el cual puede ser determinado 10 turbidimétricamente o bien nefelométricamente (Sörbo, B. (1987) "Sulfate: turbidimetric and nephelometric methods" Methods Enzymol. 143, 3-6).

#### EJEMPLOS DE REALIZACION DE LA INVENCION

15 Se describen a continuación ejemplos en los que se muestra detalladamente el procedimiento de obtención y purificación de la AGPPasa, en sus isoformas soluble y particulada, a partir de hojas de cebada. El mismo procedimiento, con 20 mínimas variaciones adecuadas a cada caso, puede aplicarse a cualquier otro tejido vegetal, para obtener las correspondientes isoformas solubles con la actividad enzimática descrita. Otros ejemplos muestran la utilización de la AGPPasa para la producción de kits (dispositivos de ensayo) 25 de determinación de azúcares-nucleótidos y de sulfonucleótidos. Otro ejemplo muestra la obtención de un cDNA completo que codifica para la AGPPasa soluble. Por último otro ejemplo muestra la obtención de plantas transgénicas.

30 Ejemplo 1: Extracción y purificación de la AGPPasa soluble obtenida a partir de hojas de cebada

18

Todos los pasos se desarrollaron a 4°C, a no ser que se indique otra cosa. El tejido vegetal (200 g) se homogeneizó con 600 mL de tampón de extracción (Mes 50 mM pH 6, EDTA 1 mM, DTT 2 mM) empleando un Waring Blender. El homogeneizado 5 se filtró a través de cuatro capas de Miracloth, se centrifugó a 100.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se ajustó al 50% de sulfato amónico. El precipitado obtenido tras 30 minutos de centrifugación a 30.000 g (20°C) fue resuspendido en 560 mL de Mes 50 mM pH 4,2, luego calentado en baño de agua a 62°C durante 20 minutos, enfriado en hielo, y centrifugado a 30.000 g durante 20 minutos. Las 10 proteínas del sobrenadante se precipitaron mediante sulfato amónico 50%, y se resuspendieron en 5,7 mL de Mes 50 mM pH 6. La muestra se sometió a continuación a filtración en gel 15 en columna Superdex 200 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) preequilibrada con Mes pH 6 y NaCl 150 mM. La elución se efectuó con el mismo tampón. La mejora opcional consiste en una purificación posterior en columna de intercambio catiónico tipo Mono S HR 5/5 (Pharmacia, 20 Uppsala, Suecia) y columna de afinidad tipo Con A Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las fracciones con actividad AGPPasa se juntaron y concentraron. Las proteínas se separaron electroforéticamente en un sistema de geles NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Novex, San Diego, 25 California).

Ejemplo 2: Extracción y purificación de la AGPPasa particulada obtenida a partir de pericarpo de frutos de tomate

30

Todos los pasos se desarrollaron a 4°C, a no ser que se indique otra cosa. El tejido vegetal (30 Kg) se homogeneizó con 30 L de tampón de extracción (HEPES 50 mM pH 7, EDTA 1

19

mM, DTT 2 mM) empleando un Waring Blender. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de Miracloth, se centrifugó a 20.000 g durante 30 min. El precipitado se resuspendió en 1.5 L de tampón de extracción con 3% de Triton X-100. La suspensión se centrifugó a 20.000 g durante 30 min tras lo cual el sedimento se resuspendió en 0,54 L de tampón de extracción con MgCl<sub>2</sub> (200 mM) o bien con α-amilasa (100 unidades/mL), β-amilasa (100 unidades/mL) y amiloglucosidasa (15 unidades/mL). Tras una hora de agitación, la suspensión se centrifugó durante media hora a 20.000 g y el sobrenadante se dializó frente a HEPES 10 mM pH 7, y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. La muestra dializada se liofilizó y se resuspendió con agua a un volumen final de 60 mL. La muestra se sometió a continuación a filtración en gel en columna Superdex 200 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) preequilibrada con HEPES pH 7 y NaCl 150 mM. La elución se efectuó con el mismo tampón. Las fracciones que mostraban actividad AGPPasa fueron sometidas a un posterior paso de purificación en columna de intercambio aniónico tipo Mono Q (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las fracciones con actividad AGPPasa se juntaron y concetraron. Las proteínas se separaron electroforéticamente en un sistema de geles NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Novex, San Diego, California).

25 Ejemplo 3: Ensayos enzimáticos

A no ser que se indique otra cosa, todas las reacciones enzimáticas se desarrollaron a 37°C. Las determinaciones de actividades AGPPasa se realizaron utilizando la determinación espectrofotométrica de G1P en dos pasos descrita por Sowokinos (1981) (Sowokinos, 1981, *Plant Physiol.* 68, 924-929). La mezcla de reacción contenía Hepes 50 mM pH 7, la cantidad especificada de ADPG y el extracto proteico en un

20

volumen total de 50 microlitros. Todos los ensayos se realizaron frente a blanco de ADPG. Tras 20 minutos de incubación, la reacción se detenía mediante ebullición en baño seco durante 2 minutos. La mezcla se centrifugaba a 5 20.000 g durante 5 minutos y se recuperaba el sobrenadante. En el segundo paso, se determinaba G1P espectrofotométricamente en 300 microlitros de mezcla conteniendo Hepes 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 15 mM, NAD<sup>+</sup> 0,6 mM, una unidad de fosfoglucomutasa y otra de glucosa-6-fosfato 10 deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, y 30 microlitros del sobrenadante resultante del paso uno. Tras 20 minutos de incubación, la producción de NADH se monitorizó a 340 nm utilizando un espectrofotómetro Multiskan EX (Labsystems). Fue despreciable la cantidad de NADH producida por cualquier extracto proteico en ausencia de ADPG en 15 el paso uno.

La masa molecular nativa de la AGPPasa se determinó mediante filtración en gel por medio de una representación del coeficiente de partición (Kav) frente al logaritmo de 20 la masa molecular de las siguientes proteínas patrones: tiroglobulina bovina (670 kDa), gamma-globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), mioglobina (17 kDa) y vitamina B-12 (1,3 kDa). El contenido en proteína se determinó por el método de Bradford utilizando el reactivo 25 preparado por Bio-Rad y gamma-globulina como patrón.

Las tablas 1 y 2 presentadas a continuación reflejan la purificación de la AGPPasa soluble a partir de hojas de cebada y la AGPpasa particulada a partir de pericarpo de tomate, respectivamente. La unidad (U) se define como la 30 cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μmol de producto por minuto.

Tabla 1

	Volumen total (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (mU)	Actividad especí- fica (mU/mg proteína)	Purifica- ción (factor)	Rendi- miento (%)
<b>Extrac- to crudo</b>	560	5107,8	105000	20,6	-	100
<b>Sobrena- dante 100000 x g</b>	520	3436,7	100500	29,2	1,4	95,7
<b>Sulfato amónico 50%</b>	520	748,6	97500	130,2	6,3	92,8
<b>PH 4,2 / 62°C</b>	520	24,9	90500	3634	176,4	86,2
<b>Sulfato amónico 50%</b>	5,7	8,1	47300	5839	283,4	45,0
<b>Superdex 200</b>	1,7	1,3	30200	23230	1127,6	28,7
<b>NuPAGE- SDS Electro- foresis</b>	1,7	0,026	30000	1161500	56350	28

Tabla 2

	Volumen total (L)	Proteína total (mg)	Actividad total (mU)	Actividad específica (mU/mg proteína)	Purificación (factor)	Rendimiento (%)
<b>Extracto crudo</b>	45	6000	51000	2,8	1	100
<b>Sedimento 20000 x g</b>	1,5	1860	36000	19,3	6,9	70
<b>Sedimento Triton</b>	0,54	1680	36000	21,4	7,6	70
<b>Sobrenad. MgCl<sub>2</sub></b>	0,54	750	30000	40	14,2	58
<b>Superdex 200</b>	0,13	36	8100	225	80,3	16
<b>Mono-Q</b>	0,057	1,5	100	66	23,6	0,2

5 Ejemplo 4: Identificación del producto con actividad enzimática obtenido

El producto con actividad AGPPasa así obtenido cumple las siguientes características:

- 10 ■ Tanto la AGPPasa soluble como la particulada son fosfodiesterasas que catalizan la hidrólisis del ADPG produciendo cantidades equimolares de G1P y AMP.
- Además del ADPG, ambas isoenzimas reconocen otras moléculas de pequeño tamaño que poseen enlaces fosfodiéster, tales como el UDP-glucosa, GDP-glucosa, bis-PNPP y otros de estructura similar. También catalizan la hidrólisis de pequeñas moléculas con enlaces fosfatosulfato, tales como el PAPS y el APS, liberando cantidades equimolares de sulfato y el correspondiente nucleótido.
- 15

- No hidrolizan moléculas con enlaces fosfomonoéster tales como la G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, y otras similares. Tampoco hidrolizan AMP cílico ni ácidos nucleicos tales como ADN y ARN, que son substratos de otras fosfodiesterasas descritas en la literatura.
- Sus requerimientos iónicos son reducidos, por lo que pueden trabajar en ausencia de iones de Magnesio, Manganeso, Cobalto, y otros cationes divalentes, que son efectores fundamentales para el funcionamiento de otras fosfodiesterasas descritas en la literatura.
- A diferencia de las pirofosfatasas de azúcar-nucleósidos difosfatos de bacterias y animales, ambas isoformas de AGPPasa hidrolizan bis-PNPP.
- Se inhiben por moléculas fosforiladas tales como el AMP, ADP, ATP, 3-fosfoglicerato, ortofosfato, pirofosfato inorgánico, y otras de características semejantes.
- Se inhiben fuertemente por molibdato y arsenato.
- Son resistentes a detergentes iónicos tales como el SDS (dodecilsulfato sódico).
- Son resistentes a la acción de una amplia gama de proteasas, como Proteinasa K y Pronasa (Boehringer).
- Su actividad no se ve afectada por la acción de inhibidores típicos de fosfodiesterasas tales como el  $\beta$ -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida, ascorbato, y otros agentes reductores y quelantes.
- Son sensibles a pH ligeramente básico y son muy estables a pH entre 4 y 7,5. Esta característica es una de las que convierten a ambas isoformas de AGPPasa en enzimas totalmente diferentes a la mayoría de las fosfodiesterasas descritas en la literatura, dado que éstas últimas son estables y activas en pHs ligeramente básicos.
- Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para ADP-glucosa, de 0,5 mMolar, la cual es unas cuatro a cinco veces inferior

24

a la  $K_m$  correspondiente a otros substratos azúcares-nucleótidos como por ejemplo ADP-ribosa, UDP-glucosa o similares. La afinidad por APS es similar a la afinidad por ADP-glucosa.

5

Algunas de las características particulares de la AGPPasa soluble son:

- La AGPPasa soluble es resistente a una temperatura de 65°C durante 30 minutos, y puede ser caracterizada por los siguientes datos:
  - Peso molecular aparente medido por filtración en gel, en torno a 35-55 kDa.
  - $K_{eq}'$  de la reacción de 110.
  - Incremento de Energía Libre estándar ( $\Delta G'$ ) de -2,9 kcal/mol.
  - En la presente invención, la caracterización de la secuencia de aminoácidos nos permite conocer otra serie de características, como son:
    - Es una glicoproteína.
    - Peso molecular aparente de la proteína purificada en geles desnaturizantes, en torno a 20 kDa.
    - Las secuencias aminoacídicas obtenidas mediante la degradación de Edman son:
      - Extremo N-terminal: SEQ ID NO: 1
      - Secuencias internas (obtenidas tras la hidrólisis parcial de la AGPPasa con tripsina): SEQ ID NO: 2 y 3

Algunas de las características particulares de la AGPPasa particulada son:

30

- Peso molecular medido por filtración en gel en torno a 400-500 kDa.

25

- Peso molecular aparente en gel desnaturizante del péptido que compone la AGPPasa particulada: 45 kDa.
  - La secuencia aminoacídica obtenida mediante la degradación de Edman es:
- 5 - Extremo N-terminal: SEQ ID NO: 4

Ejemplo 5: Obtención de un cDNA completo que codifica para la AGPPasa soluble

10 El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la AGPPasa de cebada permitió la creación de dos cebadores específicos del gen de la AGPPasa cuyas secuencias son, en sentido 5' - 3', SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de RT-PCR un cDNA completo que se introdujo en un plásmido pSK Bluescript (Stratagene) el cual fue amplificado en la bacteria hospedadora XL1 Blue. El peso molecular del péptido deducido del cDNA es de 19.5 kDa. La secuencia del cDNA es SEQ ID NO: 7.

20

Ejemplo 6: Productos con actividad AGPPasa a partir de diversos vegetales

25 El enzima AGPPasa muestra una muy amplia difusión entre los vegetales, de modo que el producto enzimático con actividad AGPPasa puede ser obtenido a partir de cualquier vegetal. Como ejemplo, se presenta la siguiente tabla II con las actividades específicas (mU / mg proteína) obtenidas en varias Monocotiledóneas y Dicotiledóneas.

30

Tabla 3

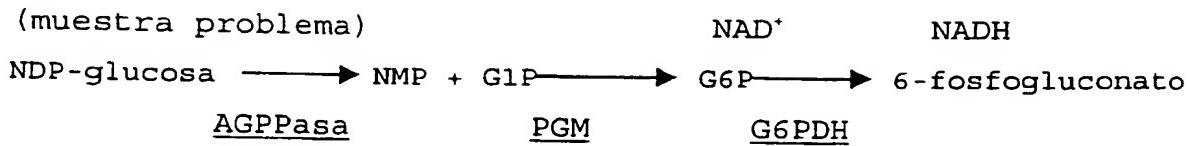
	Actividad específica (mU / mg proteína)
	(+ADPG)
<b>Monocotiledóneas</b>	
Hoja de cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	113,7 ±3,5
Hoja de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	22,4 ±2,5
<b>Dicotiledóneas</b>	
Hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Wt)	5,2 ±0,6
Hoja de pimiento ( <i>Capsicum annuum</i> )	5,0 ±0,6
Hoja de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	5,6 ±0,5
Cultivo celular de arce ( <i>Acer pseudoplatanus</i> )	16,5 ±7,2

5    Ejemplo 7: Elaboración de kits enzimáticos de determinación  
de glucosa-nucleósido difosfatos

Para la determinación de glucosa-nucleósido difosfatos tales como ADPG, UDP-glucosa, CDP-glucosa, GDP-glucosa y 10 TMP-glucosa, se elabora un kit que contiene los siguientes elementos:

- a. AGPPasa
- b. NAD
- c. Fosfoglucomutasa (PGM)
- 15 d. G6P deshidrogenasa (G6PDH)
- e. Tampón

La determinación de la cantidad de glucosa-nucleósido difosfato presente en la muestra problema se basa en la 20 determinación espectrofotométrica del NADH producido según la siguiente reacción acoplada:



5

La determinación de la cantidad de NDP-glucosa en una muestra problema tendría lugar mediante la elaboración de un cocktail cuya composición sería (para 1 ml):

- Muestra problema
  - 1 U de AGPPasa
  - 1 U de PGM
  - 1 U de G6PDH
  - 0.6 mM NAD
  - Tampón Mes o Hepes 50 mM pH 7
  - Agua (hasta completar 1 ml)

Se incuba a 37°C durante 20 minutos y se observa la variación de absorbancia de la muestra a 340 nm. Como control negativo se puede utilizar un cocktail en el que falte la AGPPasa.

Ejemplo 8: Elaboración de kits enzimáticos de determinación de nucleósido difosfatos de azúcares distintos a glucosa

25

Se preparan kits de determinación de los siguientes azúcares-nucleósido difosfatos:

- ribosa-nucleósido difosfatos (ADP-ribosa, GDP-ribosa, UDP-ribosa, CDP-ribosa o TDP-ribosa)

■ manosa-nucleósido difosfatos (ADP-manosa, GDP-manosa, TDP-manosa, UDP-manosa o CDP-manosa)

28

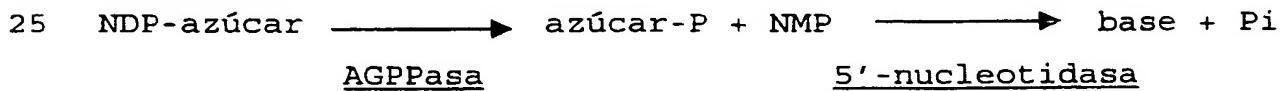
- galactosa-nucleósido difosfatos (ADP-galactosa, GDP-galactosa, UDP-galactosa o CDP-galactosa)
- glucurónico-nucleósido difosfatos (GDP-glucurónico, UDP-glucurónico, ADP-glucurónico, CDP-glucurónico o TDP-glucurónico)
- fructosa-nucleósido difosfatos (GDP-fructosa, ADP-fructosa, CDP-fructosa, UDP-fructosa, TDP-fructosa)
- galacturónico-nucleósido difosfatos (UDP-galacturónico, GDP-galacturónico, CDP-galacturónico, TDP-galacturónico o ADP-galacturónico)

En el kit intervienen los siguientes elementos:

- a. AGPPasa
- 15 b. 5'-nucleotidasa (o, alternativamente, fosfatasa alcalina)
- c. tampón

La determinación de la cantidad de azúcar-nucleósido difosfato presente en la muestra problema se basa en la determinación colorimétrica del ortofosfato liberado según la siguiente reacción enzimática acoplada:

(muestra problema)



La determinación del Pi tiene lugar según cualquiera de los múltiples métodos colorimétricos disponibles en la bibliografía y en el mercado.

29

La determinación de la cantidad de NDP-azúcar en una muestra problema tendría lugar mediante la elaboración de un cocktail (1 ml) compuesto por:

- Muestra problema
- 5 ■ 1 U de AGPPasa
- 1 U de 5'-nucleotidasa (o, alternativamente, 1 U de fosfatasa alcalina)
- Tampón Mes o Hepes 50 mM pH 7.5
- Agua (hasta completar 1 ml)

10

Se incuba a 37°C durante 20 minutos y se determina la producción del Pi liberado según técnicas convencionales. Como control negativo se puede utilizar un cocktail en el que falte la AGPPasa.

15

Ejemplo 9: Elaboración de kits enzimáticos de determinación de PAPS y APS

La estrategia de determinación de niveles de sulfonucleótidos tales como el PAPS o el APS, se basa en la determinación turbidimétrica o bien nefelométrica según la siguiente reacción:

AGPPasa



AGPPasa



30 La determinación de la cantidad de sulfonucleótido en una muestra problema tendría lugar mediante la elaboración de un cocktail (1 ml) compuesto por:

- Muestra problema

- 1 U de AGPPasa
- Tampón Mes o Hepes 50 mM pH 7.0
- Agua (hasta completar 1 ml)

5 Se incuba a 37°C durante 20 minutos y se determina la producción del sulfato liberado según técnicas convencionales. Como control negativo se puede utilizar un cocktail en el que falte la AGPPasa.

10 Ejemplo 10: Obtención de plantas transgénicas de tabaco, patata y tomate que sobreexpresan AGPPasa

Utilizando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* CECT 5387 se obtuvieron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) con alta actividad AGPPasa en todos los órganos analizados (raíz, hoja, frutos y tallo). Tales plantas presentaron las siguientes características:

1. Bajo contenido en almidón y carbohidratos de pared celular (según las técnicas de medición basadas en kits comerciales descritas en la literatura (Frehner, M., Pozueta-Romero, J., Akazawa, T. (1990) "Enzyme sets of glycolysis, gluconeogenesis, and oxidative pentose phosphate pathway are not complete in nongreen highly purified amyloplasts of sycamore cell suspension cultures" Plant Physiol. 94, 538-544)).
2. Alto contenido en azúcares solubles tales como sacarosa, glucosa-6-fosfato, glucosa y fructosa.
3. Reducción de los niveles de PAP acumulados en los tejidos, confiriendo gran resistencia a altas concentraciones de cloruro sódico en el sustrato de crecimiento, respecto a plantas no transformadas.

31

4. La morfología externa de la planta no era aberrante, tras ser comparada con la de las plantas no transformadas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Producto enzimático de origen vegetal, denominado AGPPasa, con actividad enzimática ADP-glucosa fosfo-  
5 diesterasa, caracterizado por ser una fosfodiesterasa (EC 3.1.4.9 que cataliza la hidrólisis del ADPG equimolarmente en G1P y AMP, no hidroliza moléculas con enlaces fosfomonoo-  
éster, no requiere de efectores iónicos de fosfodiesterasa, es capaz de hidrolizar bis-PNPP, se inhibe por molibdato,  
10 arsenato y moléculas fosforiladas, su actividad no se ve afectada por agentes reductores y quelantes inhibidores de fosfodiesterasas, es sensible a pH ligeramente básico y es muy estable a pH entre 4 y 7,5, es resistente a detergentes iónicos tipo SDS y a la acción de proteasas, y reconoce  
15 además del ADPG otros sustratos que poseen enlaces fosfodiéster y fosfosulfato, hidrolizándolos con una Km 4 a 5 veces superior a la del propio ADPG.
- 2.- Producto enzimático según la reivindicación 1, caracterizado por no hidrolizar, entre otros, G1P, G6P,  
20 AMP, 3-fosglicerato, AMPC, ni ácidos nucleicos.
- 3.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por no requerir como efectores, entre otros cationes divalentes, al Magnesio, Manganeso o al Cobalto.
- 4.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por ser inhibido por ortofosfato, pirofosfato inorgánico, y ésteres de fosfato tales como, entre otros, AMP, ADP, ATP, o 3-fosglicerato.
- 5.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque su actividad no es afectada, entre  
30 otros, por el  $\beta$ -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida o ascorbato.

6.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por ser resistente, entre otras, a Proteinasa K o Pronasa.

7.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 6, 5 caracterizado por reconocer como sustratos, entre otros, a la UDP-glucosa, GDP-glucosa, ADP-manosa, APS, PAPS o bis-PNPP.

8.- Procedimiento de obtención de un producto enzimático de origen vegetal con actividad ADP-glucosa fosfodiesterasa en 10 su isoforma soluble caracterizado por someter a material de origen vegetal a una extracción de la fracción proteica por un tampón, filtración del extracto, seguida de un procedimiento de purificación por sucesivas centrífugaciones y precipitaciones, con ajustes tanto del pH como de 15 la fuerza iónica del medio, incluyendo preferentemente un calentamiento de la proteína por encima de 60°C y enfriamiento en hielo, y purificación por filtración en gel, isoelectroenfoque, electroforesis en gel desnaturizante, u otros medios equivalentes de purificación de 20 proteínas extraídas a partir de tejidos vegetales.

9.- Procedimiento según la reivindicación 8 que comprende los siguientes pasos: (1) homogeneización del tejido vegetal con un tampón de extracción, por ejemplos, Mes 50 mM pH 6, EDTA 1 Mm, DTT 2 Mm, (2) filtración a través de 25 4 capas de Miracloth®, (3) ultracentrifugación a 100.000 g, (4) precipitación en sulfato amónico de las proteínas del sobrenadante, (5) resuspensión del precipitado en tampón de pH 4,2, (6) calentamiento durante al menos 15 minutos a una temperatura entre 60 y 65°C, seguido de enfriamiento en 30 hielo, (7) centrifugación a 30.000 g, (8) concentración de la proteína del sobrenadante mediante precipitación en sulfato amónico y resuspensión a pH 6, y (9) purificación

34

por cromatografía de filtración en gel, isoelectroenfoque y electroforesis en gel desnaturizante.

10.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por ser resistente a una temperatura de 65°C durante 30 minutos, y por presentar un peso molecular aparente determinado por filtración en gel en torno a 35-55 kDa, así como por mostrar una  $K_{eq}'$  de la reacción de 110, siendo su  $\Delta G'$  de -2,9 Kcal/mol, y su  $K_m$  para ADPG de 0,5 mMolar.

10 11.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por haber sido aislado a partir de cualquier especie vegetal.

12.- El producto enzimático de las reivindicaciones 1 a 7 obtenible por el procedimiento de la reivindicaciones 8 y  
15 9.

13.- Uso del producto enzimático de las reivindicaciones 1 a 12 en la fabricación de dispositivos y/o composiciones de ensayo de aplicación en la determinación de azúcares-nucleósido difosfatos.

20 14.- Dispositivo de ensayo para la determinación de azúcares-nucleósido difosfatos caracterizado porque incluye el producto enzimático de las reivindicaciones 1 a 12, de tal modo que la determinación se basa en el azúcar-1-fosfato liberado durante la reacción catalizada  
25 por la AGPPasa.

15.- Dispositivo de ensayo para la determinación de azúcares-nucleósido difosfatos caracterizado porque incluye el producto enzimático de las reivindicaciones 1 a 12, de tal modo que la determinación se basa en el nucleósido monofosfato producido durante la reacción catalizada por la AGPPasa.

30 16.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 14, caracterizado porque la determinación se basa en la

glucosa-1-fosfato liberada, la cual es sometida al enzima fosfoglucomutasa para producir glucosa-6-fosfato, que a su vez se hace reaccionar acopladamente con NAD' o NADP', por acción del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, obteniéndose 6-fosfogluconato y NADH o NADPH, determinables uno u otro por métodos espectrofotométricos, o de otra naturaleza, convencionales.

17.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 15, caracterizado porque la determinación se basa en el nucleósido-monofosfato, el cual es susceptible de liberar ortofosfato, además de la base correspondiente, por acción de un enzima como 5'nucleotidasa, siendo el ortofosfato fácilmente determinable por métodos convencionales, por ejemplo colorimétricos.

18.- Dispositivo de ensayo según las reivindicaciones 14 y 15, caracterizado porque la determinación se basa en que el azúcar-1-fosfato y el nucleósido-monofosfato son susceptibles de liberar ortofosfato por acción de un enzima como fosfatasa alcalina o 5'nucleotidasa, siendo el ortofosfato fácilmente determinable por métodos convencionales, por ejemplo colorimétricos.

19.- Producto enzimático según la reivindicación 1, caracterizado por comprender dos isoformas del enzima una soluble y otra asociada a los gránulos de almidón existentes en vegetales.

20.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 y 19, caracterizado porque la isoforma soluble contiene en su secuencia al menos uno de los fragmentos polipeptídicos representados en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3

30 21.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 y 19-20, caracterizado por obtenerse a partir de un cDNA completo, representado por SEQ ID NO: 7, mediante dos cebadores obtenidos a su vez a partir de las regiones 5' y

36

3', representados por SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 respectivamente, del gen que codifica para la AGPPasa soluble.

22.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1 y 19,  
5 caracterizado porque la isoforma asociada al almidón presenta un peso molecular nativo determinado por filtración en gel de 400-500 kDa, y tiene una  $K_m$  para ADPG en torno a 0,5 mM.

23.- Producto enzimático según las reivindicaciones 1, 19 y  
10 22, caracterizado porque la isoforma asociada a almidón contiene en su secuencia al menos un fragmento polipeptídico representado en SEQ ID NO 4.

24.- Procedimiento de obtención de la isoforma de AGPPasa  
asociada a almidón caracterizado por someter al material de  
15 origen vegetal a una extracción de la fracción proteica por  
un tampón, o bien con enzimas hidrolíticas al almidón,  
seguido de sucesivas centrifugaciones y precipitaciones,  
con ajustes tanto del pH como de la fuerza iónica del  
medio, cromatografía de intercambio iónico, isoelectroenfoque,  
20 filtración en gel, y electroforesis en gel desnaturalizante,  
u otros medios equivalentes de purificación de proteínas extraídas a partir de tejidos vegetales.

25.- Procedimiento según la reivindicación 24 que comprende  
los siguientes pasos: (1) homogeneización del tejido  
vegetal con un tampón de extracción, por ejemplo HEPES 50  
mM pH 7, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, (2) filtración a través de 4  
capas de Miracloth, (3) centrifugación a 20.000 g, (4)  
resuspensión del sedimento en tampón de extracción con 3%  
Triton X-100, (5) centrifugación a 20.000 g, (6)  
30 tratamiento con 200 mM MgCl<sub>2</sub>, o con enzimas hidrolíticas de  
almidón, tipo α-amilasa, β-amilasa y/o amiloglucosidasa,  
(7) centrifugación a 20.000 g, (8) concentración de las  
proteínas, (9) purificación por cromatografía de filtración

37

en gel, intercambio iónico, isoelectroenfoque y electroforesis en gel desnaturizante.

26.- Uso de cualquiera de las isoformas de la AGPPasa de la reivindicación 19, o de ambas, en la fabricación de dispositivos y/o composiciones de ensayo para determinar nucleósidos difosfato de azúcares, independientemente que sean o no de glucosa.

27.- Uso de cualquiera de las isoformas de la AGPPasa de la reivindicación 19, o de ambas, para determinar la presencia de 3'-fosfoadenosina 5'fosfatosulfato (PAPS).

28.- Uso de cualquiera de las isoformas de la AGPPasa de la reivindicación 19, o de ambas, para determinar adenosina 5'fosfatosulfato (APS).

29.-Uso del producto enzimático de las reivindicaciones 1, 15 12 y 19 a 23, en la obtención de plantas transgénicas que sobre-expresan el enzima AGPPasa isoforma soluble.

30.- Procedimiento de obtención de plantas transgénicas que sobre-expresan la isoforma de AGPPasa soluble caracterizado por utilizar un vector de transformación que contenga un plásmido que incluya el cDNA del gen de dicha AGPPasa.

31.- Procedimiento de obtención de plantas transgénicas según la reivindicación 30 caracterizado porque el vector de transformación es *Agrobacterium tumefaciens*.

32.- Procedimiento de obtención de plantas transgénicas 25 según la reivindicación 31 caracterizado porque el vector de transformación son cepas de *Agrobacterium tumefaciens* CECT5387.

33.- Procedimiento de obtención de plantas según las reivindicaciones 30 a 33 caracterizado porque la planta transformada es una dicotiledónea y preferentemente tomate, patata o tabaco.

34.- Plantas transgénicas con reducido contenido en almidón y resistentes a salinidad alta caracterizadas por ser

obtenidas según el procedimiento de las reivindicaciones 30  
a 33.

35.- Plantas transgénicas con reducido contenido en almidón  
y resistentes a salinidad alta caracterizadas por  
5 sobreexpresar el gen de la AGPPasa soluble.

36.- Plantas transgénicas según la reivindicación 35  
caracterizadas por ser plantas dicotiledóneas y  
preferentemente tomate, patata o tabaco.

37.- Procedimiento según la reivindicación 9 que comprende  
10 opcionalmente entre las etapas de filtración en gel y la de  
isoelectroenfoque, una cromatografía de intercambio catiónico  
seguida de una cromatografía de afinidad con  
Concanavalina A.

38.- Procedimiento según la reivindicación 10 que comprende  
15 opcionalmente entre las etapas de filtración en gel y la de  
isoelectroenfoque, una cromatografía de intercambio catiónico  
seguida de una cromatografía de afinidad con  
Concanavalina A.

39.- Dispositivo de ensayo para la determinación de  
20 sulfonucleósidos, caracterizado porque incluye los productos  
enzimáticos de las reivindicaciones 1 a 7, 10-12 y 19 a  
23 de tal modo que la determinación se basa en el sulfato  
liberado.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD PUBLICA DE NAVARRA  
<120> "ADPglucosa pirofosfatasa vegetal, procedimiento de obtención, uso en la fabricación de dispositivos de ensayo y en la obtención de plantas transgénicas"  
<130> PCT-79  
<160> 9  
<210> 1  
<211> 20  
<212> Péptido  
<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett  
<220>  
<223> Extremo N-terminal de AGPPasa soluble

&lt;400&gt;

Leu Thr Gln Asp Phe Cys Val Ala Asp Leu Thr Cys Ser Asp Thr  
5 10 15  
Pro Ala Gly Tyr Pro  
20

<210> 2  
<211> 5  
<212> Péptido  
<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett  
<220>  
<223> Secuencia tríptica de AGPPasa soluble

&lt;400&gt;

Lys Thr Leu Tyr Lys

2

<210> 3  
<211> 8  
<212> Péptido  
<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett  
<220>  
<223> Secuencia tríptica de AGPPasa soluble

&lt;400&gt;

Lys Ser Val Leu Gly Gly Ser Gly

5

<210> 4  
<211> 20  
<212> Péptido  
<213> Lycopersicon esculentum  
<220>  
<223> Fragmento del extremo N-terminal obtenido mediante degradación de Edman de la AGPPasa particulada

&lt;400&gt;

Lys Val Glu Val Cys Glu Ile Asn Leu Lys Leu Leu Tyr Cys Ala  
5 10 15  
Asn Gly Ala Lys Phe  
20

<210> 5  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett  
<220>  
<223> Cebador de la región 5' de la AGPPasa soluble

3

&lt;400&gt;

gccatggccaacgcaatgttgctccctgtc 30

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Hordeum vulgare cv. Scarlett

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cebador de la región 3' de la AGPPasa soluble

&lt;400&gt;

ccgacacgctgacaccacgacgacc 24

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Hordeum vulgare cv. Scarlett

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cDNA soluble

&lt;400&gt;

gta gca agc cat ggc caa cgc aat gtt gct	30
ccc tgt cct cgt ctc ctt cct cgt cct gcc	60
ctt ctc cgc cat ggc cct gac cca gga ctt	90
ctg cgt cgc cga cct gtc ctg cag cga cac	120
gcc ggc ggg gta ccc gtg caa gac cgg cgt	150
cgg cgc ggg gga ctt cta cta cca cgg cct	180
cgc cgc cgc ggg caa cac cag caa cct cat	210
caa ggc ggc cgt aac ccc ggc ctt cgt cgg	240
cca gtt ccc cgg cgt gaa cgg gct cgg cat	270
ctc tgc ggc gag gct cga cat cgc cgt ggg	300
cgg cgt cgt gcc gat gca cac cca ccc ggc	330
cgc ctc tga gct cct ctt cgt cac tga ggg	360

4

cac	cat	ctt	ggc	ggg	ctt	cat	cag	ctc	ctc	390
ctc	caa	cac	cgt	gta	cac	caa	gac	gct	cta	420
caa	ggg	cga	cat	cat	ggt	gtt	ccc	cca	ggg	450
cct	gct	cca	cta	cca	gta	caa	cgg	tgg	cag	480
ctc	ctc	cgc	ggt	agc	gct	cgt	tgc	gtt	cag	510
cgg	ccc	caa	ccc	agg	cct	cca	gat	cac	tga	540
cta	cgc	gct	ctt	cgc	caa	caa	cct	gcc	atc	570
cgc	cgt	cgt	tga	gaa	ggt	cac	ctt	ctt	gga	600
cga	cgc	gca	ggt	gaa	gaa	gct	caa	gtc	cgt	630
gct	cgg	cgg	cag	cgg	cta	att	aag	cag	ttc	660
tca	gca	aag	gtc	gtc	gtg	gtg	tca	gcg	tgt	690
cgg										693

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; proteína

&lt;213&gt; Hordeum vulgare cv. Scarlett

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; AGPPasa soluble deducida del cDNA

&lt;400&gt;

Met	Ala	Asn	Ala	Met	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Val
				5					10					15
Leu	Pro	Phe	Ser	Ala	Met	Ala	Leu	Thr	Gln	Asp	Phe	Cys	Val	Ala
				20					25					30
5	Asp	Leu	Ser	Cys	Ser	Asp	Thr	Pro	Ala	Gly	Tyr	Pro	Cys	Lys
				35					35	40				45
Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Asp	Phe	Tyr	Tyr	His	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala
				50					50	55				60
10	Gly	Asn	Thr	Ser	Asn	Leu	Ile	Lys	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Ala
				65					65	70				75
Val	Gly	Gln	Phe	Pro	Gly	Val	Asn	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Ala	Ala
				80					80	85				90
15	Arg	Leu	Asp	Ile	Ala	Val	Gly	Gly	Val	Val	Pro	Met	His	Thr
				95					95	100				105
Pro	Ala	Ala	Ser	Glu	Leu	Leu	Phe	Val	Thr	Glu	Gly	Thr	Ile	Leu
				110					110	115				120
Ala	Gly	Phe	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Asn	Thr	Val	Tyr	Thr	Lys	Thr
				125					125	130				135

Leu Tyr Lys Gly Asp Ile Met Val Phe Pro Gln Gly Leu Leu His  
140 145 150  
Tyr Gln Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Ser Ala Val Ala Leu Val Ala  
5 155 160 165  
Phe Ser Gly Pro Asn Pro Gly Leu Gln Ile Thr Asp Tyr Ala Leu  
170 175 180  
Phe Ala Asn Asn Leu Pro Ser Ala Val Val Glu Lys Val Thr Phe  
185 190 195  
10 Leu Asp Asp Ala Gln Val Lys Lys Leu Lys Ser Val Leu Gly Gly  
200 205 210  
Ser Gly

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES 01/00021

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C12N 9/16, 15/55, 15/82, A01H 1/00, G01N 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STRAND, WPI, HCPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VALLELIAN-BINDSSCHEDLER, L., et al Structure, expresion and localizacion of a germin-like protein in barley ( <i>Hordeum vulgare L.</i> ) that is insolubilized in stressed leaves. 1998. Plant. Mol. Biol. 37:297-308 Cited in the application	1-7, 10-12, 19-23
P,X	BAROJA-FERNÁNDEZ, E., et al. "Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphatase and ADPglucose pyrophosphorylase occur in the suspension-cultured cells of sycamore. 2000 FEBS Lett. 480, 277-282 Cited in the application	1-7, 10-15, 19-24, 26
P,X	RODRIGUEZ-LOPEZ, M. et al. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis" 2000 Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 8705-8710 Cited in the application	13-18

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2001 (22.05.01)

Date of mailing of the international search report

08 June 2001 (08.06.01)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 01/00021

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. et al. Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves ( <i>Hordeum vulgare L.</i> ) are distinctologomers of HvGLP1, a germin-like protein 2001 FEBS Lett. 490 (1,2), 44-48 Cited in the application	1-7, 10-12, 19-23
A	EP 485044 A2 (INSTITUT FUR GENBIOLOGISCHE FORSSCHUNG BERLIN GMBH) 13 May 1992 (13.05.92) The whole document	30-36
A	VAN DIJK, WILLEM et al. A universal and rapid spectrophometric assay of CMP-siatic acid hidrolase and nucleoside-diphosphosugar pyrophosphatase activities ans detection in polyacrylamide gels. 1981 Anal. Biochem. 117(2), 346-53	13-18,26
A	PUHAKAINEN, E. et al UDPglucuronic acid pyrophosphatase assay with the aid of alkaline phosphatase 1977 Acta Chem. Scand., Ser. B, B31(2), 125-9	13-18,26
A	JP 52061286 A (JAPAN MONOPOLY CORP.) 1977.05.20 (resumen) World Patents Index [en linea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [recuperado en día 2001.05.10] Retrieve from: EPOQUE, EPO, DW 197726, access N° 1977-46195 Y	8-9,24-25, 37-38

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/ES 01/00021

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 485044	13.05.1992	CA 2055150	09.05.1992
		DE 4035756	14.05.1992
		AU 8702191	14.05.1992
		IE 913884	20.05.1992
		JP 5236971	17.09.1993
		AU 655209	08.12.1994
		US 5492820	20.02.1996
		HU 215255	30.11.1998
JP 52061286			

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES 01/00021

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> C12N 9/16, 15/55, 15/82, A01H 1/00, G01N 33/50

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> C12N A01H

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

STRAND, WPI, HCPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	VALLELIAN-BINDSSCHEDLER, L., et al Structure, expresion and localizacion of a germin-like protein in barley ( <i>Hordeum vulgare L.</i> ) that is insolubilized in stressed leaves. 1998, Plant. Mol. Biol. 37:297-308. Citado en la solicitud.	1-7, 10-12, 19-23
P,X	BAROJA-FERNÁNDEZ, E., et al. "Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphatase and ADPglucose pyrophosphorylase occur in the suspension-cultured cells of sycamore. 2000 FEBS Lett. 480, 277-282. Citado en la solicitud.	1-7, 10-15, 19-24, 26
P,X	RODRIGUEZ-LOPEZ, M. et al. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis" 2000 Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 8705-8710. Citado en la solicitud.	13-18

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 22 mayo 2001 (22.05.2001)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

8 JUN 2001 - 8.06.01

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

Marta Hdez. Cuéllar

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
nº de fax +34 91 3495304

nº de teléfono + 34 91 349 55 45

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 01/00021

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. et al. Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves ( <i>Hordeum vulgare L.</i> ) are distinctologomers of HvGLP1, a germin-like protein 2001 FEBS Lett. 490 (1,2), 44-48 Citado en la solicitud.	1-7, 10-12, 19-23
A	EP 485044 A2 (INSTITUT FUR GENBIOLOGISCHE FORSSCHUNG BERLIN GMBH) 13.05.1992 Todo el documento.	30-36
A	VAN DIJK, WILLEM et al. A universal and rapid spectrophometric assay of CMP-siatic acid hidrolase and nucleoside-diphosphosugar pyrophosphatase activities ans detection in polyacrylamide gels. 1981 Anal. Biochem. 117(2), 346-53.	13-18,26
A	PUHAKAINEN, E. et al UDPglucuronic acid pyrophosphatase assay with the aid of alkaline phosphatase 1977 Acta Chem. Scand., Ser. B, B31(2), 125-9.	13-18,26
A	JP 52061286 A (JAPAN MONOPOLY CORP.) 1977.05.20 (resumen) World Patents Index [en linea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [recuperado en día 2001.05.10] Recuperado de: EPOQUE, EPO, DW 197726, Nº de acceso 1977-46195 Y.	8-9,24-25, 37-38

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 01/00021

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 485044	13.05.1992	CA 2055150	09.05.1992
		DE 4035756	14.05.1992
		AU 8702191	14.05.1992
		IE 913884	20.05.1992
		JP 5236971	17.09.1993
		AU 655209	08.12.1994
		US 5492820	20.02.1996
		HU 215255	30.11.1998
JP 52061286			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**